

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-245697

(43) 公開日 平成8年(1996)9月24日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/705		8517-4H	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/725		8517-4H	C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			G 0 1 N 33/566	

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-57187

(22) 出願日 平成7年(1995)3月16日

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武
田春日ハイツ1402号

(72) 発明者 藤井 亮

茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武
田春日ハイツ303号

(72) 発明者 伊藤 康明

茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地の16

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 ウサギ胃幽門部平滑筋由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、スクリーニング方法またはスクリーニング用キットで得られる化合物またはその塩、化合物またはその塩を含有する医薬組成物、該蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体。

【効果】 G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項2】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項3】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項4】 配列番号：2で表される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。

【請求項5】 請求項3記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

【請求項6】 請求項5記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法。

【請求項8】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

【請求項9】 (i) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii) 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項10】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項11】 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項2記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ウサギ胃幽門部平滑筋由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

【0002】

2

【従来の技術】 多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

【0003】 胃や小腸などの消化器官では、多くのホルモン・ホルモン様物質・神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで、種々の消化液が分泌され、食物の消化・吸収が行われている。これらの物質は、胃や小腸などに存在する、それぞれに対応するレセプターによってその分泌が制御されていると考えられている。特に、消化管ホルモンと呼ばれるセクレチン、ガストリン、コレシストキニン、パソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド、モチリン、サブスタンスP、ソマトスタチン、ニューロテンシンなどは、消化管内腔からの物理的・化学的刺激あるいは神経性の刺激に反応して分泌されるが、その真の生理作用は不明な点も多い。また、モチリンはレセプター蛋白質cDNAの構造に関する知見は、これまでに報告されていない。さらに、未知のレセプター蛋白質やレセプター蛋白質サブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。

【0004】 胃や小腸の複雑な機能を調節する物質とその特異的レセプターとの関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。そして胃や小腸の機能を調節するためのレセプター蛋白質に対するアゴニスト/アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、レセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ウサギ胃幽門部平滑筋由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、および該蛋白質ならびにDNAの用途を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをより効率的に単離するための合成DNAプライマーを用いてウサギ胃幽門部平滑筋由来のcDNAをPCRにより増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするウサギ由来のcDNAを単離し、その部分的な構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の部分的な相同性が認められたことから、ウサギの胃で発現機能している新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見から、これらのDNAを用いれば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することもできることを見いだした。さらに、本発明者らは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用い

ば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行なうこともできることを見いだした。

【0007】より具体的には、本発明者らは、[図1]に示すウサギ胃幽門部平滑筋由来の新規なcDNA断片をPCR法によって増幅し、プラスミドベクターにサブクローニングした(pMN7)。その部分配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることを明らかになった。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ[図1]、第2、第3、第4、第5および第6膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された[図2]。また、増幅されたcDNAのサイズも、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第2膜貫通領域と第6膜貫通領域の間の塩基数と比較して同程度の約0.8kbであった。G蛋白質共役型レセプター蛋白質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つの蛋白質ファミリーを形成している。そこで、本件の新規レセプター蛋白質DNA(pMN7に含まれるcDNA)によってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行なったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるラットβ₂-アドレナリンレセプター蛋白質(A41679)、ラットセロトニン(5-HT₆)レセプター蛋白質(JN0591)、イヌヒスタミンH₂レセプター蛋白質(A39008)、ヒトソマトスタチンレセプター(タイプ4)蛋白質(JN0605)、ヒトドーパミンD₂レセプター蛋白質(S11377)、ラットニューロテンシンレセプター蛋白質(JH016

4)、ヒトコレシストキニンBレセプター蛋白質(JC1352)およびラットガストリンレセプター蛋白質(JQ1614)とアミノ酸でそれぞれ、27%、29%、27%、27%、24%、23%、31%および30%のホモロジーを有する全く新規なレセプター蛋白質であることが判明した。また本件の新規レセプター蛋白質DNAによってコードされるアミノ酸配列を用いて疎水性プロットを作成した結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に特徴的な疎水性ドメインの存在が明らかとなった。これらのことから、本発明の新規レセプター蛋白質がG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーに属するものであることがわかる。上記の()内の略語は、NBRF-PIRにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるものである。

【0008】すなわち、本発明は、(1)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(2)第(1)項記載のいずれかのG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(3)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(4)配列番号：2で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(3)項記載のDNA、(5)第(3)項記載のいずれかのDNAを含有することを特徴とするベクター、(6)第(5)項記載のベクターを保持する形質転換体、(7)第(6)項記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、(8)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0009】(9)(i)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと第(1)項記載のいずれかのG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする方法、(10)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、および(1

1) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0010】より具体的には、(12)蛋白質が、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。(13)リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ インテスティナル アン ド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine(1L-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(8)項記載のリガンドの決定方法、

【0011】(14)標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(15)標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物

またはその塩のスクリーニング方法、(16)標識したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0012】(17)標識したリガンドを第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(18)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(19)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(6)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0013】(20)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物がアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ インテスティナル アン

ド、リレイテッド、ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーテッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine (IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(18)項または第(19)項記載のスクリーニング方法、(21)第(9)項、第(14)項〜第(20)項記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩、(22)第(21)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物。

【0014】(23)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング用キット、

(24)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜両方を含有することを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング用キット、(25)第(10)項、第(23)項または第(24)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、(26)第(25)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、および(27)第(11)項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の定量法を提供する。

【0015】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、温血動物(例えば、トリ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル、ヒトなど)のあらゆる組織(例えば、胃、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば何なるものであってもよい。すなわち、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約90~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナ

ル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0016】より具体的には、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するウサギ胃幽門部平滑筋由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。さらに、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁-アシル基など)で保護されているもの、GluのN端側が生体内で切断され、該Gluがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁-アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0017】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、[図2]で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドで

も良い。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓊酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0018】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide)、Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製分離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0019】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Poly

merase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増幅することもできる。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するウサギ胃平滑筋由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0020】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローン化されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0021】G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものであってもよい。

【0022】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、λPLプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、

ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α ・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0023】宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

【0024】酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら, ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻ CHO細胞), マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞な

どが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0025】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0026】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質

13

転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0027】宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], D MEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0028】上記培養物からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりG蛋白質共役型レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含ま

14

れるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0029】かくして得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するG蛋白質共役型レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニンエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0030】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、①本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に、本発明の組み替え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよび抗体の用途について、以下により具体的に説明する。

【0031】(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法本発明のG蛋白質共

役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索または決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレティッドペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えば温血動物（例えば、トリ、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0032】具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。本発明のリガンド決定方法においては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペ

チドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0033】より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0034】④試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0035】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型

レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献

〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

【0036】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

【0037】細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500 r

pm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0038】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識したアンギオテンシン、モンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine(1L-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、1-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが好適である。

【0039】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アトラス

社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~500000cpm)の $[^3H]$ 、 $[^{35}S]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{32}P]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0040】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の④~⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質

を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution(ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂ 95%airで2日間培養したもの。

【0042】③標識試験化合物

市販の $[^3H]$ 、 $[^{35}S]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{32}P]$ などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定する。

【0043】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンギオテンシン、モンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブインテスティナルアンドリレイテッドペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αお

よび β -chemokine (IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが挙げられる。

【0044】(2)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に体するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、

(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)脳細胞などに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

【0045】本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするのである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリー

のような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0046】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0047】(3)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、リガンドに対して結合性を有しているため、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明の定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくは

その塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

【0048】(4)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)などが含まれる。

【0049】すなわち、本発明は、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを接触させた場合と(ii)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドを接触させた場合と(ii)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0050】より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0051】③標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物(例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方

法、および

【0052】⑤本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物（例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど）を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0053】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量

発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。

【0054】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。したがって、本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0055】本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm~3000rpm）で短時間（通常、約1分~10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm~3

27

0 0 0 0 r p m) で通常 3 0 分〜2 時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1 細胞当たり $10^5 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0056】リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①〜③を実施するためには、適当な G 蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G 蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型の G 蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型 G 蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドと G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まず G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4〜10(望ましくは pH 6〜8)のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンド X とレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。

【0057】さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml〜10 ml の該レセプター溶液に、一定量(5000 cpm〜500000 cpm)の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4} M \sim 10^{-10} M$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は 0℃から 50℃、望ましくは 4℃から 37℃で 20 分から 24 時間、望ましくは 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγカウン

28

ターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B₀)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B₀-NSB)を 100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば 50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0058】リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の④〜⑤の方法を実施するためには、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、G 蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株(例えば、マウス脾臓 B 細胞株 M1N6 など)、前述の組換え型 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0059】リガンドと本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリ

ーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05% のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、 4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

【0060】②G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、 37°C 、5% CO_2 、95% air で2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [^3H]、[^{125}I]、[^{14}C]、[^{35}S] などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1 \mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで 1mM となるように溶解し、 -20°C で保存する。

【0061】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液 1ml で2回洗浄した後、 $490 \mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10} \text{M}$ の試験化合物溶液を $5 \mu\text{l}$ 加えた後、標識リガンドを $5 \mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3}M のリガンドを $5 \mu\text{l}$ 加えておく。

③反応液を除去し、 1ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを 0.2N NaOH - 1% SDS で溶解し、 4ml の液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent of Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0062】

【数1】

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB: Percent of Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0063】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物また

はその塩 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているため、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。

【0064】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0065】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液 (例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど) などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール (例えば、エタノール)、ポリアルコール (例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤 (例えば、ポリソルベ

ート80 (TM)、HCG-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0066】(5)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【モノクローナル抗体の作製】

(a)モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩(以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある)は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常

2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0067】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[ネイチャー(Nature)、256、495(1975)]に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0068】抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、G蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培

地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、白水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0069】(b)モノクローナル抗体の精製

抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（1）および（2）の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、（2）被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。

【0070】本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体（以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある）を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のFab'、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばG蛋白質共役型レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測

定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0071】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のG蛋白質共役型レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗G蛋白質共役型レセプター抗体はG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0072】本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の

標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0073】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江

寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。

【0074】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があ

り得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとす

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸

【0075】

EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸

【0076】

Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4(R)-カルボキ
サミド基	

【0077】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

50 【配列番号: 1】 pMN7に含まれるウサギ胃幽門部平

37

滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

【配列番号：2】pMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

【配列番号：3】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

【配列番号：4】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。後述の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) J M109/pMN7は、平成7年2月22日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-5011として寄託されており、また平成7年2月27日から財団法人発酵研究所 (IFO) にIFO 15803として寄託されている。

【0078】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0079】

【参考例1】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

公知のヒト由来ガラニンレセプター (HUMGALAREC)、ラット由来 α -1B-アドレナジックレセプター (RATADR1B)、ヒト由来 β -1-アドレナジックレセプター (HUMADRB1)、ウサギ由来IL-8レセプター (RABIL8RSB)、ヒト由来オピオイドレセプター (HUMOP1ODRE)、ウシ由来サブスタンスKレセプター (BTSKR)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-2 (HUMSR12A)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSSTR3Y)、ヒト由来ガストリンレセプター (HUMGARE)、ヒト由来コレシストキニンAレセプター (HUMCCKAR)、ヒト由来ドパミンレセプター-D5 (HUMD1B)、ヒト由来セロトニンレセプター-5HT1E (HUM5HT1E)、ヒト由来ドパミンレセプター-D4 (HUMD4C)、マウス由来セロトニンレセプター*

38

*-2 (MMSERO)、ラット由来 α -1A-アドレナジックレセプター (RATADRA1A) およびラット由来ヒスタミンH2レセプター (S57565) の第2膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0080】また、公知のヒト由来ガラニンレセプター (HUMGALAREC)、ラット由来A1アデノシンレセプター (RAT1ADREC)、ブタ由来アンジオテンシンレセプター (PIGA2R)、ラット由来セロトニンレセプター (RAT5HTRTC)、ヒト由来ドパミンレセプター (S58541)、ヒト由来ガストリンリリーシングペプチドレセプター (HUMGRP R)、マウス由来GRP/ボンベシンレセプター (MUSGRPBOM)、ラット由来バスキュラータイプ1アンジオテンシンレセプター (RRVT1A11R)、ヒト由来ムスカリニックアセチルコリンレセプター (HSHM4)、ヒト由来 β -1アドレナジックレセプター (HUMDRB1)、ヒト由来ガストリンレセプター (HUMGARE)、ラット由来コレシストキニンレセプター (RATCCKAR)、ラット由来リガンド不明レセプター (S59748)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター (HUMSSTR28A)、ラット由来リガンド不明レセプター (RNGPROCR)、マウス由来ソマトスタチンレセプター-1 (MUSSR11A)、ヒト由来 α -A1-アドレナジックレセプター (HUMA1AADR)、マウス由来デルタオピオイドレセプター (S66181) およびヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSSTR3Y) の第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0081】上記の()内の略語はDNASIS Gene/Proteinシークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、通常エントリーネームと呼ばれるものである。特に、多くのレセプター蛋白質をコードするcDNAで一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプターcDNAと配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を有する合成DNA2本を作成した。

5'-GYCACCAACNWS TTCATCCTSWNHCTG-3'

(SはGまたはCを示し、YはCまたはTを示し、WはAまたはTを示し、HはA、CまたはTを示し、NはIを示す。)

(配列番号：3)

5'-ASNSANRAAGSARTAGANGANRGGR TT-3'

(RはAまたはGを示し、SはGまたはCを示し、NはIを示す。)

(配列番号：4)

S、Y、W、H、RおよびSは、合成時に複数の塩基に混合して合成する。

【0082】

【実施例1】ウサギ胃幽門部平滑筋からのpoly(A)⁺R

NA両分の調製およびcDNAの合成

ウサギ胃幽門部平滑筋よりグアニジンイソチオシアネート法により Total RNAを調製後 (Kaplan B.B. et al., Biochem. J. 183, 181-184 (1979))、mRNA精製キット (ファルマシア社) を用いて、poly(A)⁺RNA画分を調製した。次に、poly(A)⁺RNA画分5 μ gにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BRL社) を加え、モロニマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL社) により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はフェノール:クロロホルム (1:1) で抽出し、エタノール沈殿を行なった後、30 μ lのTEに溶解した。

【0083】

【実施例2】ウサギ胃幽門部平滑筋由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅と塩基配列の決定

実施例1でウサギ胃幽門部平滑筋より調製したcDNA 1 μ lを鋳型として使用し、参考例1で合成したDNAプライマーを用いてPCRによる増幅を行なった。反応液の組成は、合成DNAプライマー (配列: 5' プライマー配列および3' プライマー配列) 各100 pM、0.25 mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1 μ lおよび酵素に付属のバッファー10 μ lで、総反応溶液量は100 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、96 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、45 $^{\circ}$ C \cdot 1分、60 $^{\circ}$ C \cdot 3分のサイクルを25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

【0084】

【実施例3】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解説による新規レセプター候補クローンの選択

実施例2で行なったPCR後の反応産物は1.4%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、エレクトロエリユーション、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR⁺IIへサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝酒造株式会社) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体を100クローン得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置PI-100 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNA

の一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。

【0085】塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解説した。得られた塩基配列を基に、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いてホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシエリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pMN7の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を〔図1〕に示した。さらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図1〕、疎水性プロット〔図2〕を行なった結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また、アミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行なった結果、例えば、ラット由来 β -アドレナリンレセプター蛋白質 (A41679) と27%、ラット由来セロトニン (5-HT₆) レセプター蛋白質 (JN0591) と29%、イヌ由来ヒスタミンH₂レセプター蛋白質 (A39008) と27%、ヒト由来ソマトスタチンレセプター (タイプ4) 蛋白質 (JN0605) と27%、ヒト由来ドーパミンD₂レセプター蛋白質 (S11377) と24%、ラット由来ニューロテンシンレセプター蛋白質 (JH0164) と23%、ヒト由来コレシストキニンBレセプター蛋白質 (JC1352) と31%、ラット由来ガストリンレセプター蛋白質 (JQ1614) と30%のホモロジーを有する新規なレセプター蛋白質であることが判明した。上記の()内の略語は、NBRF-PDIRにデータとして登録される際の整理番号であり、通常 Accession Number と呼ばれるものである。

【0086】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは、①リガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に、G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0087】

【配列表】

【配列番号: 1】

配列の長さ: 252

配列の型: アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：ペプチド

配列

Val Asp Leu Leu Ala Ala Leu Thr Leu Met Pro Leu Ala Met Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Ala Leu Phe Asp His Ala Leu Phe Gly Glu Val Ala Cys Arg
 20 25 30
 Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Val Cys Phe Val Ser Leu Ala Ile Leu Ser
 35 40 45
 Val Ser Ala Ile Asn Val Glu Arg Tyr Tyr Tyr Val Val His Pro Met
 50 55 60
 Arg Tyr Glu Val Arg Met Lys Leu Gly Leu Val Ala Ser Val Leu Val
 65 70 75 80
 Gly Val Trp Val Lys Ala Leu Ala Met Ala Ser Val Pro Val Leu Gly
 85 90 95
 Arg Val Ser Trp Glu Glu Gly Pro Pro Ser Val Pro Pro Gly Cys Ser
 100 105 110
 Leu Gln Trp Ser His Ser Ala Tyr Cys Gln Leu Phe Val Val Val Phe
 115 120 125
 Ala Val Leu Tyr Phe Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile Leu Val Val Tyr
 130 135 140
 Cys Ser Met Phe Arg Val Ala Arg Val Ala Ala Met Gln His Gly Pro
 145 150 155 160
 Leu Pro Thr Trp Met Glu Thr Pro Arg Gln Arg Ser Glu Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro Gln Thr Thr Pro
 180 185 190
 His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val Leu Leu Ala Val
 195 200 205
 Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe Ser Phe His Leu
 210 215 220
 Tyr Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ala Ala Gly Gln Val Glu Asn
 225 230 235 240
 Val Val Thr Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser
 245 250

【0088】

【配列番号：2】

配列の長さ：756

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GTGGACCTGC TGGCTGCCCT GACCCTCATG CCTCTGGCCA TGCTCTCCAG CTCGCCCTC 60
 TTTGACCAGC CCCTCTTTGG GGAGGTGGCC TGCCGCTCT ACTTGTCTCT GAGCGTCTGC 120
 TTTGTCAGCC TGGCCATCCT CTCGGTGTCC GCCATCAATG TGGAGCGCTA CTATTATGTG 180
 GTCCACCCCA TGGCTATGA GGTGCGCATG AACTGGGGC TGGTGGCCTC TGTGCTGGTG 240
 GCGGTGTGGG TGAAGGCCCT GGCCATGGCT TCTGTGCCAG TGTGGGAAG GGTGTCCTGG 300
 GAGGAAGGCC CTCCAGTGT CCCCCAGGC TGTCACTCC AATGGAGCCA CAGTGCCTAC 360
 TGCCAGCTTT TCGTGGTGGT CTTGCGGTC CTCTACTTCC TGCTGCCCT GCTCCTCATC 420
 CTTGTGGTCT ACTGCAGCAT GTTCCGGTG GCTCGTGTGG CTGCCATGCA GCACGGGCCG 480
 CTGCCACGT GGATGGAGAC GCGCCGCAA CGCTCCGAGT CTCTCAGCAG CCGCTCCACT 540
 ATGGTACCA GCTCGGGGGC CCGCAGACC ACCCTCACC GGACGTTTGG CGGAGGGAAG 600
 GCAGCAGTGG TCCTCCTGGC TGTGGAGGA CAGTTCCTGC TCTGTTGGTT GCCCTACTTC 660

43

44

TCCTTCCACC TCTATGTGGC CCTGAGCGCT CAGCCCATTG CAGCGGGGCA GGTGGAGAAC 720
GTGGTGACCT GGATTGGCTA CTCTGCTTC ACCTCC 756

【0089】

【配列番号: 3】

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴: NはIを示す。

配列

GYCACCAACN WSTTCATCCT SWNHCTG 27

【0090】

【配列番号: 4】

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴: NはIを示す。

配列

ASNSANRAAG SARTAGANGA NRGRTT 27

【0091】

【図面の簡単な説明】

【図1】ウサギ胃幽門部平滑筋よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンpMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列(第1番目~第540番目)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の5'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図2】ウサギ胃幽門部平滑筋よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンpMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列(第541番目~第810番目)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の3'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図3】図1および図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、pMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図からT M 2~T M 6で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

【図2】

549	558	567	576	585	594
TCC GAG TCT CTC AGC AGC CGC TCC ACT ATC GTC ACC ACC TCG GGG GCC CCG CAG					
Ser Glu Ser Leu Ser Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro Gln					
603	612	621	630	639	648
ACC ACC CCT CAC CGG ACC TTT GGC GGA GGG AAG GCA GCA GTG GTC CTC CTG GCT					
Thr Thr Pro His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val Leu Leu Ala					
657	666	675	684	693	702
GTG GGA GGA CAG TTC CTG CTC TGT TGG TTG CCC TAC TTC TCC TTC CAC CTC TAT					
Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe Ser Phe His Leu Tyr					
711	720	729	738	747	756
GTG GCC CTG AGC GCT CAG CCC ATT GCA GCG GGG CAG GTG GAG AAC GTG GTC ACC					
Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ala Ala Gly Gln Val Glu Asn Val Val Thr					
765	774	783	792	801	810
TGG ATT GCC TAC TTC TGC TTC ACC TCC <u>AAC GCT CTC CTC TAT TCC TTC CTC CCT</u> 3'					
Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser					

【図1】

```

          9       18       27       36       45       54
5'  GCC ACC AAC CTG TTC ATC CTC TGT CTG GTG GAC CTC CTC CCT GCG CTG ACC CTC
      .....
      Val Asp Leu Leu Ala Ala Leu Thr Leu

          63       72       81       90       99       108
ATG CCT CTG GCC ATG CTC TCC AGC TCC GCC CTC TTT GAC CAC GCC CTC TTT GGG
      .....
Met Pro Leu Ala Met Leu Ser Ser Ser Ala Leu Phe Asp His Ala Leu Phe Gly

          117      126      135      144      153      162
CAG CTG GCC TGC CCG CTC TAC TTG TTC CTG AGC CTC TGC TTT GTC ACC CTG GCC
      .....
Glu Val Ala Cys Arg Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Val Cys Phe Val Ser Leu Ala

          171      180      189      198      207      216
ATC CTC TCG GTG TCC GCC ATC AAT GTG GAG CCC TAC TAT TAT GTG GTC CAC CCC
      .....
Ile Leu Ser Val Ser Ala Ile Asn Val Glu Arg Tyr Tyr Tyr Val Val His Pro

          225      234      243      252      261      270
ATG CCG TAT GAG GTG CGC ATG AAA CTG GGG CTG GTG GCC TCT GTG CTG GTG GGC
      .....
Met Arg Tyr Glu Val Arg Met Lys Leu Gly Leu Val Ala Ser Val Leu Val Gly

          279      288      297      306      315      324
GTG TGG GTG AAG GCC CTG GCC ATG GCT TCT GTG CCA GTG TTG GGA AGG GTG TCC
      .....
Val Trp Val Lys Ala Leu Ala Met Ala Ser Val Phe Val Leu Gly Arg Val Ser

          333      342      351      360      369      378
TGG GAG GAA GGC CCT CCC AGT GTC CCC CCA CGC TCT TCA CTC CAA TCG AGC CAC
      .....
Trp Glu Glu Gly Pro Pro Ser Val Pro Pro Gly Cys Ser Leu Cln Trp Ser His

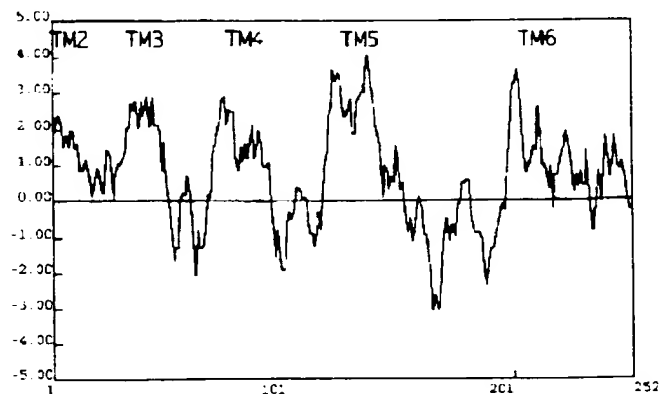
          387      396      405      414      423      432
AGT GCC TAC TGC CAG CTT TTC GTG GTG GTC TTC GCC GTC CTC TAC TTC CTG CTG
      .....
Ser Ala Tyr Cys Gln Leu Phe Val Val Val Phe Ala Val Leu Tyr Phe Leu Leu

          441      450      459      468      477      486
CCC CTG CTC CTC ATC CTT GTG GTC TAC TGC AGC ATG TTC CGG GTG GGT CGT GTG
      .....
Pro Leu Leu Leu Ile Leu Val Val Tyr Cys Ser Met Phe Arg Val Ala Arg Val

          495      504      513      522      531      540
GCT GCC ATG CAG CAC GGG CCG CTG CCC ACG TGG ATG GAG ACC CCC CGG CAA CGC
      .....
Ala Ala Met Gln His Gly Pro Leu Pro Thr Trp Met Glu Inn Pro Arg Gln Arg

```

【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/566			A 6 1 K 39/395	N
// A 6 1 K 39/395			48/00	
48/00		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

